

褶皱臂尾轮虫不同时期休眠卵的超微结构

张东升 姜静颖

(大连水产学院,大连 116023)

摘要 分别用光学显微镜、扫描电子显微镜和透射电子显微镜对褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)新产的和隔年的休眠卵形态结构进行观察。结果表明,两个时期的休眠卵外壳结构有区别,隔年卵外壳较薄,壳纹不明显;新卵外壳厚,壳纹明显。进行轮虫休眠卵分类时应以后者为准。新产休眠卵无气室,而隔年休眠卵有气室。进一步观察表明,休眠卵气室中的气体由休眠期间的代谢活动而产生。扫描电镜下,新产休眠卵有2层卵膜,隔年休眠卵有3层卵膜;透射电镜下,二者均为3层卵膜,不同时期休眠卵的每层卵膜厚度及细微结构有所差别。这两个时期的休眠卵胚胎结构上均有2层,但内含物有所不同。

关键词 褶皱臂尾轮虫,休眠卵,超微结构

有关轮虫休眠卵形态学上的研究,最早始于19世纪末,但仅限于光学显微镜下的观察描述。50年代以来,王家辑^[1]、代田昭彦^[2]、考尔舍特^[3]也仅对轮虫休眠卵做了宏观描述。直至70年代,对轮虫休眠卵的研究才更加深入,包括对几种晶囊轮虫(*Asplanchna* spp)新产休眠卵外表面扫描电镜观察^[4],对新产萼花臂尾轮虫(*Brachionus calyciflorus*)休眠卵和西氏昌囊轮虫(*A. sieboldi*)休眠卵的透射电镜观察^[5]。国内翟宝香、李永函^[6]又对萼花臂尾轮虫隔年休眠卵的卵膜做了显微和亚显微结构观察,但对同一种轮虫不同时期休眠卵结构上的差异,尚未见报道。本文报道了褶皱臂尾轮虫(*B. plicatilis*)新产和隔年休眠卵的超微结构上的差异。

1 材料和方法

1.1 休眠卵

新产休眠卵是1993年10月由隔年休眠卵培育轮虫后产生的,于显微镜下挑选后,保存在4℃左右的冰箱中。隔年休眠卵采于大连南关岭养鱼池底泥中,冰箱中保存,采卵法同翟宝香等^[6]。

1.2 光镜样品制备

冰箱内保存1周以内的休眠卵取出后直接放于

载玻片上,于光镜下拍照,并测量大小。

1.3 扫描电镜样品制备

将两种休眠卵经蒸馏水反复冲洗,再用磷酸缓冲液冲洗3次,酒精梯度脱水,丙酮置换酒精,在HITCH;HCP-2临界点干燥仪上干燥。干燥后置于解剖镜下,用解剖针挑开部分休眠卵的外壳,分别将挑开壳的和完好的休眠卵粘在标本台上,用JFC-1100离子溅射仪喷金,电镜下拍照。

1.4 透射电镜样品的制备

将冰箱中的休眠卵取出,2%戊二醛固定2h,再用1%锇酸固定1.5h,然后用磷酸缓冲液冲洗,酒精梯度脱水,丙酮置换酒精,Epon-812树脂与丙酮混合液渗透,Epon-812树脂包埋,用超薄切片机切去休眠卵的一半,再用树脂与丙酮混合渗透与包埋,用超薄切片机分别切半薄切片、超薄切片,透射电镜下观察并拍照。

2 结果

2.1 光镜下休眠卵的形态结构

新产出的休眠卵呈卵肾形,无气室,胚胎颜色为分布不均的黄棕色,并位于壳内大端,卵壳外表有明显的线纹(图版I-1);隔年休眠卵亦呈卵肾形;有气室,于水中气室端朝上;胚胎呈分布很均匀的淡黄

收稿日期:1997-12-01

色,位于壳内大端,卵壳线纹不明显(图版 I-7)。两种休眠卵的大小见表 1。

2.2 扫描电镜下的观察

新产休眠卵有 2 层膜:卵膜 S_1 及 S_2 。 S_1 的外表凹凸不平、无孔、无明显的卵盖(图版 I-2); S_1 气室端内表面较光滑,其上均匀分布一些小圆坑(图版 I-3),胚胎端内表面不光滑,有小突起和沟(图版 I-4);气室端断面观分 2 层,外层疏松,有较大的孔,内层致密(图版 I-3),胚胎端只有 1 层,结构

同气室端的外层。 S_2 紧包胚胎,低倍镜下,外表光滑,高倍镜下可见密集的褶皱突起(图版 I-5,6)。

隔年休眠卵有 3 层膜:卵膜 S_1 、 S_2 和 S_3 (图版 I-10)。 S_1 外表较平,无褶皱突起(图版 I-8),内表面形态同新产休眠卵(图版 I-9);气室端断面观也分 2 层,内层致密,外层稍疏松,孔隙较少(图版 I-9)。 S_2 的外表具有不规则的褶皱突起(图版 I-11)。 S_3 的外表面起伏不平,表面有小凹陷(图版 I-12)。

表 1 褶皱臂尾轮虫不同时期休眠卵大小

Table 1 The size comparison of resting eggs of *B. plicatilis* at two different states

名称 name	项目 item	测定范围/nm measure range	平均值及标准差/nm $\bar{X} \pm SD$	测定个数 n
新产休眠卵 new born resting eggs	卵壳长 shell length	102.50~127.10	120.54 \pm 7.08	19
	卵壳宽 shell width	65.60~90.20	84.71 \pm 6.36	19
	胚胎长 embryo length	82.00~113.16	102.33 \pm 7.19	19
	胚胎长:卵壳长/% embryo length/shell length	77.40~90.00	84.91 \pm 7.25	19
隔年休眠卵 one year latter resting eggs	卵壳长 shell length	102.50~131.20	117.10 \pm 7.11	19
	卵壳宽 shell width	69.70~90.21	80.61 \pm 5.14	19
	胚胎长 embryo length	82.00~110.70	94.20 \pm 8.33	19
	胚胎长:卵壳长/% embryo length/shell length	70.47~85.19	79.91 \pm 4.61	19

2.3 透射电镜下的观察

2.3.1 新产休眠卵

分卵膜和胚胎 2 部分(图版 II-1)。

卵膜 分内、中、外 3 大层。(1)外层最厚,气室端和胚胎端的结构、厚度都不相同,气室端卵膜厚,平均 1.50~1.75 μm ,其中又分 2 小层,外层厚 1.0~1.5 μm ,由大小、形状不同的孔隙形成较疏松的网状结构,孔隙较大(图版 II-2);内层结构电子密度较大、质地均匀、无孔隙,厚 0.5~0.6 μm ;胚胎端卵膜薄,只有 1 层,结构同气室端卵膜的外层。(2)中层厚 0.3~0.4 μm ,电子密度最大,分为 2 小层,外层厚 0.26~0.27 μm ,电子密度大,质地均匀,外表有褶皱突起,与扫描电镜下新产休眠卵此层的外表结构基本相同;内层厚 30~40 nm,似胶状物,常有乳头突起与内层相嵌(图版 II-4)。(3)内层包被于胚胎的外面,厚 25~35 nm,外面电子密度大,里面电子密度小,有球形的、半球形的电子密度大的颗粒间隔地排列于内层的内表面(图版 II-4)。

胚胎 分内、外 2 层(图版 II-3,4),内、外层之间被 2 层分离的膜隔开,这 2 层膜偶而似缝隙连接方式互相粘合(图版 II-4)。胚胎外层较薄占整个胚胎的很少一部分,内有一椭圆形的细胞核(图版 II

-5)。胚胎内层,占整个胚胎的 40%,具有多而大的致密浓染颗粒,似脂质滴,还有很多似次级溶酶体的内含物(图版 II-6)。

2.3.2 隔年休眠卵

也分卵膜和胚胎 2 部分(图版 III-1)。

卵膜 分 3 大层。(1)外层结构同新产休眠卵,稍薄,总厚 1.2~1.4 μm ,外小层厚 0.9~1.1 μm ,内小层厚 0.2~0.3 μm ,外层网状结构孔隙变小,外表面起伏较小(图版 III-2,3)。(2)中层结构同新产休眠卵但较厚,外小层厚 0.48 μm 左右,内小层厚 0.08 μm 左右,总厚约 0.64 μm 。外小层表面褶皱小而少,内小层变得致密(图版 III-4),内外小层在气室端分开形成气室(图版 III-1)。(3)内层厚 80~100 nm,只有 1 层,上面间隔分布一些与新产休眠卵内层内表面上相同的球形致密颗粒(图版 III-5)。

胚胎 同新产休眠卵一样,分内、外 2 层,但内含物与新产休眠卵明显不同。这 2 部分中内含物的电子密度和成分很均一(图版 III-6),由于隔年休眠卵制片不全,未看到完整的胚胎,还有待于进一步研究。

3 讨论

3.1 两种休眠卵的卵膜 S_1 差别

轮虫休眠卵是轮虫在不良环境条件下形成的一种滞育结构,其外有 1 层坚硬的外壳,壳上有壳纹等装饰物,壳纹因种而异^[1]。本观察表明,同一种轮虫新产出的和隔年的休眠卵其外壳结构也不相同。新产休眠卵上的壳纹明显且大,外壳壳厚,隔年休眠卵壳纹不明显,外壳壳薄,这很可能是因为隔年休眠卵在泥中滞留至少半年,由泥沙磨擦所致。因此,研究轮虫休眠卵分类时,应以新产休眠卵为准。

3.2 休眠卵的卵膜结构

褶皱臂尾轮虫新产休眠卵卵膜的透射电镜观察可见 3 大层,这与 Wurdak^[5]对蓼花臂尾轮虫和西氏晶囊轮虫休眠卵卵膜的观察一致。笔者认为,这很可能是休眠卵卵膜的共性。但这 3 种轮虫休眠卵卵膜的每一大层微细结构各不相同。褶皱臂尾轮虫与蓼花臂尾轮虫的更接近,特别是最外层卵膜在结构和组成上完全一致,而与晶囊轮虫卵膜相差较远。至于这 2 种臂尾轮虫与本属其它种类的休眠卵最外层卵膜结构是否相同,还有待于进一步研究。

Wurdak 认为蓼花臂尾轮虫休眠卵最外层卵膜分 2 小层^[5],而翟宝香、李永函^[6]认为分 3 小层,但本文只观察到 2 小层,究竟是由于地区或种间的差异造成的,还是由于制片原因造成的,还有待于进一步探索。

3.3 关于休眠卵的气室

新产休眠卵没有气室,隔年休眠卵有气室,气室中气体究竟是从外界进入休眠卵的,还是休眠卵本身代谢产生,这一问题已有研究者探讨过^[6,7,9],认为气体很可能是轮虫胚胎的代谢产物。对褶皱臂尾

轮虫新产和隔年休眠卵的光镜和电镜对比表明:休眠卵在休眠期间有代谢活动,并使 S_2 、 S_3 层加厚, S_2 层在气室端分开形成气室。 S_2 、 S_3 层加厚,更加强了对胚胎的保护作用,Wurdak^[5]认为 S_1 和 S_2 具有半透膜作用,而李永函^[8]认为卵膜对外界环境因子具有选择吸收功能。笔者在实验时,观察到隔年休眠卵干燥后,胚胎萎缩,经加入原水池中的水后,又重新恢复,而气室中的气体仍然存在,这说明卵膜不阻挡水的自由进入,而气室中的气体却不能自由进入,否则,如果是底泥中的气体进入胚胎内,卵膜就失去其生物学意义。

致谢:本文承蒙李永函、翟宝香老师的指导,电镜操作得到宋良国、李泽生协助,在此一并表示感谢。

参 考 文 献

- 1 王家骥. 中国淡水轮虫志. 北京: 科学技术出版社, 1961. 3~21
- 2 代田昭彦(日). 水产饵料生物学. 刘世英, 雍文岳译. 东京: 恒星社厚生阁, 1975. 385~393
- 3 考尔舍特(俄). 比较胚胎学. 庄孝慧译. 北京: 科学出版社, 1957
- 4 Gibert J J. Species-specific morphology of resting eggs in the rotifer *Asplanchna*. Transactions of the American Microscopical Society, 1978, 97(3):330~339
- 5 Wurdak E S. Fine structure of the resting eggs of the rotifers *Brachionus calyciflorus* and *Asplanchna sieboldi*. Transactions of the American Microscopical Society, 1978, 97(1):49~72
- 6 翟宝香, 李永函. 用电镜对两种轮虫休眠卵卵膜的初步研究. 大连水产学院学报, 1987, 7(1):9~28
- 7 Богословский А С. Материалы к изучению покоящихся яиц коловраток(сообщение 1) бюллетень М о - ва исп природы оид биологии т. L X V (6) стр. 1963. 50~67.
- 8 李永函, 丁建华. 养鱼池轮虫休眠卵分布和萌发的研究. 水生生物学报, 1985, 9(1):20~31
- 9 李永函, 张东升. 池塘习见轮虫休眠卵的形态和鉴定. 大连水产学院学报, 1991, 6(1):1~12

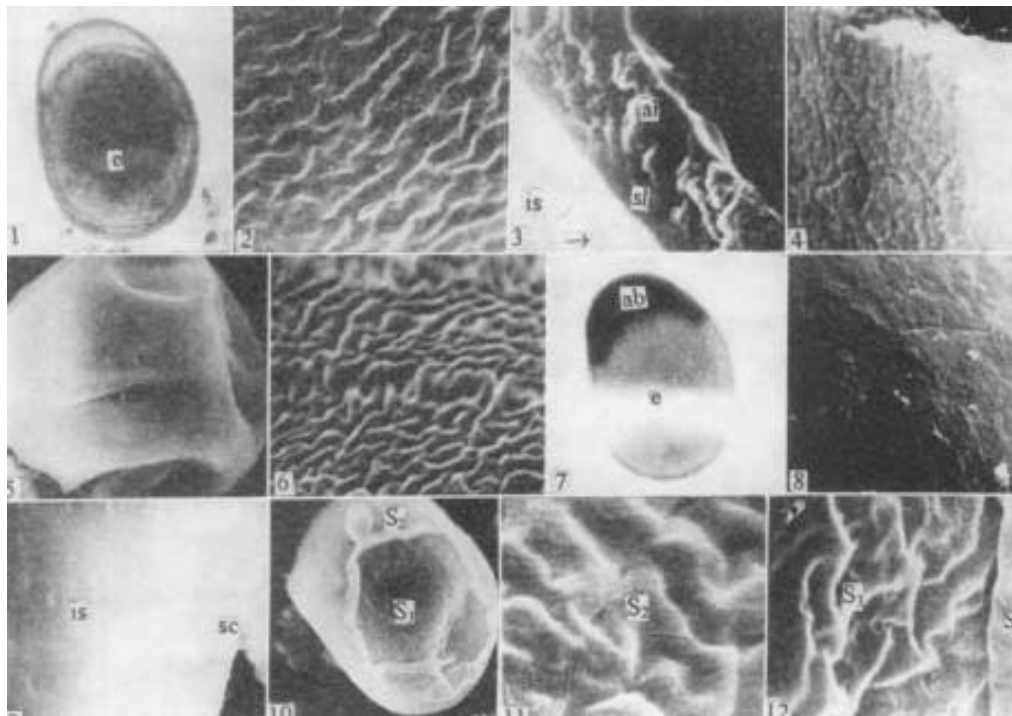
Ultrastructural studies on resting eggs of *Brachionus plicatilis* at different stages

Zhang Dongsheng Jiang Jingying
(Dalian Fisheries College, Dalian 116023)

Abstract The ultrastructures of newborn and several-year-old resting eggs of the rotifer *Brachionus plicatilis* were observed under light microscope, scanning electron microscope and transmission electron microscope. The shell structure of several-year-old egg is different from that of the newborn. On the other hand, the stripes in the outer shell surfaces of newborn resting eggs are distinct, but those of the several-year-old

eggs are not. Observations showed that there is an air bubble in the several - year - old resting egg which was produced during the metabolism when it resting, but in the newborn egg there is not. Under scanning electron microscope, two shell layers are found in every newborn resting egg, whereas there are three shell layers in the several - year - old egg. Under transmission electron microscope, both have three shell layers, in which the ultrastructure and thickness are different. There are two layers in both kinds of embryos with different contents.

Key words *Brachionus plicatilis*, resting egg, ultrastructure

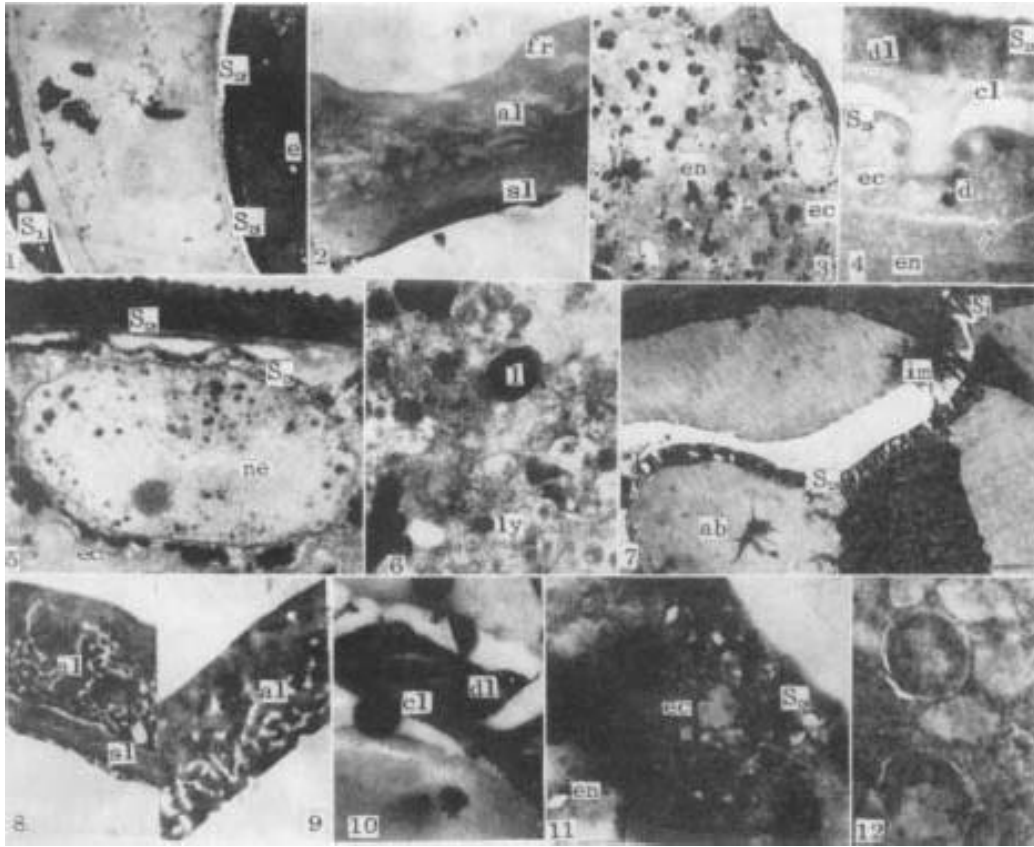


图版 I 休眠卵的光镜和扫描电镜观察

Plate I Micrograph and scanning electron micrograph for the resting eggs

- 1 新产休眠卵的光镜观, $\times 240$ 。Micrograph of a newly-laid resting egg.
 - 2-6 新产休眠卵的扫描电镜观。Scanning electron micrograph of a newly-laid resting egg.
 - 2 S_1 外表面观, $\times 4\ 000$ 。External surface view of S_1 .
 - 3 气室端 S_1 内表面及断面观(箭头示小坑), $\times 20\ 000$ 。Inner surface view and cross-sectional view of S_1 in air bubble.
 - 4 胚胎端 S_1 内表面及断面观, $\times 15\ 000$ 。Inner surface view and cross-sectional view of S_1 in an embryo.
 - 5 S_2 的外表面观, $\times 300$ 。External surface view of S_2 .
 - 6 S_2 外表面放大, $\times 20\ 000$ 。External surface view of S_2 magnified.
 - 7 隔年休眠卵光镜观, $\times 240$ 。Micrograph of one year latter resting egg.
 - 8-12 隔年休眠卵扫描电镜观。Scanning electron micrograph of one year latter resting eggs.
 - 8 S_1 外表面观, $\times 4\ 000$ 。External surface view of S_1 .
 - 9 气室端 S_1 内表面及断面观, $\times 2\ 000$ 。Inner surface view and cross-sectional view of S_1 in air bubble.
 - 10 S_1 、 S_2 、 S_3 外表面观, $\times 250$ 。External surface view of S_1 , S_2 , S_3 .
 - 11 S_2 外表面观, $\times 20\ 000$ 。External surface view of S_2 .
 - 12 S_3 外表面观, $\times 10\ 000$ 。External surface view of S_3 .
- S_1 - 第 1 层卵膜 the first shell layer; S_2 - 第 2 层卵膜 the second shell layer; S_3 - 第 3 层卵膜 the third shell layers; 胚胎 embryo; a) - 网状层 alve-

olar layer; sl - 致密层 dense layer; is - 内表面 inner surface; ab - 气室 air bubble; sc - 第 1 层卵膜的断面 section, cross-sectional view of the first shell layer.



图版 II 新产休眠卵的透射电镜观察

Plate II Transmission electron micrograph of new born resting eggs

- 1 S₁、S₂、S₃ 及胚胎, ×2 000。S₁, S₂, S₃ and embryo.
- 2 S₁ 层放大, ×1 2000。Magnification of a S₁ layer.
- 3 胚胎内层及外层, ×2 000。The interior and exterior of an embryo.
- 4 S₂、S₃ 及部分胚胎, ×40 000。S₂, S₃ and a part of an embryo.
- 5 胚胎外层细胞核, ×10 000。The nucleus of the exterior of an embryo.
- 6 胚胎内层, ×10 000。The interior of an embryo.
- 7 S₁、S₂ 胚胎及气室的位置, ×2 500。The position location of S₁, S₂, embryo and air bubble.
- 8 气室端第 1 层卵膜 ×20 000。The first shell layer in air bubble.
- 9 胚胎端第 1 层膜, ×15 000。The first shell layer in an embryo.
- 10 胚胎端的第 2 层卵膜, ×25 000。The second shell layer in an embryo.
- 11 第 3 层卵膜, 胚胎外层及内层, ×50 000。The third shell layer, interior and exterior of an embryo.
- 12 胚胎内层, ×50 000。The interior of an embryo.

im - 杂质 impurity; fr - 褶皱突起 fold projection; ec - 胚胎外层 exterior of an embryo; en - 胚胎内层 interior of an embryo; dl - 第 2 层卵膜的致密层 dense layer of S₂; d - 致密小体 dense body; il - 第 2 层卵膜的内小层 inner layer of S₂; l - 似脂质滴 a droplet of lipid; ly - 胚胎外层细胞核 the nucleus in the exterior of an embryo; ne - 似溶酶体 a lysosome-like organelle; ↑ - 胚胎外层细胞核 the arrowhead indicating the gap junction - like between interior and exterior of an embryo.